

Manuela Reyes Estebanez<sup>1</sup>

Gabriela Heredia Abarca<sup>2</sup>

María Marcela Gamboa Angulo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Calle 43 No. 130, Chuburná, Mérida 97200, Yucatán, México. <sup>2</sup>Departamento de Biología de Suelos, Instituto de Ecología A.C., Km. 2.5 carretera antigua Xalapa-Coatepec, Xalapa 91000, Veracruz, México

Biological profile of anamorphic fungi from southeast Mexico

**Abstract.** Leaf litter fungi *Beltraniella japonica*, *B. portoricensis*, *Beltraniopsis* sp., *Gliomastix murorum* and MR45 were cultured in two liquid media, Czaapeck-Dox-yeast extract (CDY) and potato dextrose broth (PDB). In each case, mycelium was separated from the broth filter, and both were macerated with EtAcO, producing filtrate fungal extracts (FFE) and mycelium extract (MFE). These were evaluated by the reduction of radical 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay, and by microdilution antimicrobial test against four pathogenic microorganisms. The results showed high ability to DPPH reduction in FFE of *B. japonica*, *G. murorum*, and MR45 in PDB and CDY. The highest antimicrobial activity was detected against *S. aureus* produced by both *Beltraniella* strains (200 µg) in PDB and against *E. carotovora* by MFE of *B. japonica* in CDY. In both media, this strain produced mellein, no other metabolite was identified from the active extracts. The biological profile and initial chromatographic explorations of the active extracts confirm metabolic diversity in our tropical fungi, which could be utilized to improve the production of metabolites useful in pharmacy and agriculture.

**Key words:** Antimicrobial, antioxidants, tropical fungi, mellein.

**Resumen.** Los hongos *Beltraniella japonica*, *B. portoricensis*, *Beltraniopsis* sp., *Gliomastix murorum* y MR45 asociados a hojarasca, se cultivaron en dos medios líquidos, Czaapeck-Dox-extracto de levadura (CDL) y caldo de papa dextrosa (CPD). En cada caso, el micelio se separó del filtrado y ambas fases se sometieron a maceración con AcOEt obteniendo los correspondientes extractos fúngicos de filtrado (EFF) y micelio (EFM). Éstos se evaluaron en los ensayos de reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y el antimicrobiano por microdilución contra cuatro patógenos. Los resultados mostraron una alta capacidad antioxidante en los EFF de *B. japonica*, *G. murorum* y MR45, en los medios CPD y CDL. La actividad antimicrobiana más alta se detectó contra *S. aureus*, producido por las dos cepas de *Beltraniella* (200 µg) en CPD y contra *E. carotovora* en el EFM de *B. japonica* en CDL. En ambos medios, *B. japonica* produce meleína, no obstante, para las demás cepas activas no se identificaron los componentes. El perfil biológico y las exploraciones preliminares por cromatografía de gases – espectrometría de masas (CG-EM) de los extractos activos confirman la versatilidad metabólica de los hongos del trópico mexicano, los cuales pueden ser susceptibles de manipulación para la producción de metabolitos útiles en farmacia y agricultura.

**Palabras clave:** Antimicrobianos, antioxidantes, hongos tropicales, meleína.

Received 11 August 2008; accepted 30 November 2008.

Recibido 11 de agosto 2008; aceptado 30 de noviembre 2008.

Autor para correspondencia: María Marcela Gamboa Angulo  
mmarcela@cicy.mx

## Introducción

Los hongos son ampliamente reconocidos como una fuente prolífica de metabolitos secundarios con una gran diversidad estructural, a los cuales se les han atribuido diversas propiedades biológicas de gran beneficio para la humanidad. Entre ellos se encuentran la penicilina (*Penicillium chrysogenum*) y las cefalosporinas (*Cephalosporium chrysogenum*) antibióticos de amplio espectro utilizadas en medicina humana (Adrio y Demian, 2003); en el campo de la agricultura se encuentra la beauvericina de *Beauveria brongniartii* (Strasser *et al.*, 2000), las ofiobolinas de *Cochliobolus heterostrophus* como nematicidas (Anke y Sternner, 2002); y alantrifenona, alantripineno y alantrileunona (*Eupenicillium* spp.) como insecticidas (Fabio *et al.*, 2005), entre otros.

Los reportes en la literatura, sugieren que la producción de metabolitos secundarios se realiza en la idofase, que es aquella en la cual el crecimiento activo ha cesado (Calvo *et al.*, 2002; Keller *et al.*, 2005). Por otra parte, la cantidad y variedad de estos se produce en respuesta a factores abióticos (pH, temperatura, disponibilidad de nutrientes, espacio, luz y agua) y bióticos (interacción con bacterias, actinomicetos, hongos, protozoarios, artrópodos, nematodos, etc.) que desvían el curso normal del metabolismo primario (Frisvad *et al.*, 1998; Strohl, 2000; Adrio y Demian, 2003). Esto se refleja en los cultivos *in vitro*, donde la variación de los nutrientes y las condiciones de incubación son utilizados como una estrategia para inducir o estimular una mayor producción de metabolitos secundarios bioactivos (Casas-López *et al.*, 2004; Keller *et al.*, 2005). En general, la industria farmacéutica, prefiere los cultivos sumergidos, ya que el proceso es más simple, la disponibilidad de nutrientes y la aeración son más homogéneos, las rutas bioquímicas oxidativas se conservan el mayor tiempo posible, además de que el tiempo de

crecimiento es menor que en el estado sólido, permitiendo el control de parámetros como pH, temperatura, nutrientes, etc. (Robinson *et al.*, 2001).

En particular, en nuestros laboratorios se han detectado hongos anamórficos de la región sureste de México con promisorio potencial biotecnológico. Entre éstos se seleccionaron a las cepas de *Beltraniella japonica*, *B. portoricensis*, *Beltraniopsis* sp., *Gliomastix murorum* y MR45 por mostrar un amplio espectro de actividad antimicrobiana y/o antioxidante al ser cultivados en el arroz fermentado (Reyes-Estebanez *et al.*, datos no mostrados). Aun cuando éstos géneros han sido aislados en otros sitios, la actividad biológica no ha sido previamente documentada, por lo cual resulta de gran interés continuar estudiando estos hongos. Con estos antecedentes, en el presente estudio se planteó como objetivo evaluar la capacidad metabólica de las cepas seleccionadas para producir principios activos en dos medios líquidos, así como de iniciar la caracterización química de éstos, mediante el análisis por CG-EM.

## Materiales y métodos

### Cepas fúngicas

Las cepas fúngicas *Beltraniella japonica* (GH18), *B. portoricensis* (MR42), *Beltraniopsis* sp. (GH19), *Gliomastix murorum* (MR36) y MR45 se obtuvieron del cepario del Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C.

### Suspensión de esporas

Las cepas se inocularon en agar-maíz (AM) y se incubaron a 25 °C, con fotoperíodo de 12/12 horas luz/oscuridad, de 7 a 15 días. Cuando la superficie de la caja se cubrió totalmente se adicionaron 5.0 mL de una solución de cloruro de sodio al 0.85 % - tween 20 al 0.05 % (SST) (Gómez-López *et al.*, 2005) y con un portaobjetos estéril se desprendieron las

esporas cuidadosamente para obtener la suspensión correspondiente (Höller *et al.*, 2000).

### Cultivos líquidos

En matraces Erlenmeyer de 250 mL se depositaron 100 mL de a) caldo papa dextrosa (CPD, Bioxon) y b) Czapek Dox enriquecido con extracto de levadura (CDL), ajustados a pH 5 y 7 con ácido fosfórico, respectivamente. Éstos se inocularon con 1.0 mL de la suspensión de esporas de cada hongo y se mantuvieron a 25 °C, con fotoperíodo de luz/oscuridad de 12/12 horas, con una velocidad de agitación de 150 rpm, durante 20 días. Como blanco se utilizó el medio de cultivo con 1.0 mL de SST, sin inocular. Todos los experimentos se realizaron por triplicado (Trigos *et al.*, 2005).

Al finalizar el período de crecimiento el caldo de cultivo se separó por filtración obteniendo la biomasa micelial y el filtrado. A éste último se le determinó el pH y ambas fases se liofilizaron, reportando la biomasa micelial en peso seco. Posteriormente, los liofilizados se sometieron a extracción con acetato de etilo a temperatura ambiente, por 24 horas, repitiendo el proceso tres veces. El disolvente se eliminó a presión reducida usando un rotavapor (Buchi), con baño de agua a 40 °C (Pittayakhajonwut *et al.*, 2008).

### Métodos analíticos

Los análisis por cromatografía de gases – espectrometría de masas (CG-EM) se realizaron en un cromatógrafo Agilent Technologies 6890N inyectando 0.4 µL de muestra a una concentración del 2 %, a una columna HP DB-5MS [(5 % difenil- 95 % dimetil polisiloxano, 30 m largo, 0.32 mm d.i., 0.5 µm espesor de la película], flujo de Helio = 1.2 mL/min,  $T_1 = 140$  °C,  $T_2 = 300$  °C, gradiente de 8 °C/min] acoplado a un detector de masas selectivo Agilent Technologies 5975B. Los componentes se reportaron en minutos por su tiempo de retención ( $t_r$ ) en el CG y por su patrón de fragmentación en el EM, los cuales se compararon con la base de datos NIST 05MS spectra, 2006, software del equipo. El espectro de

resonancia magnética nuclear de protón (RMN  $^1\text{H}$ ) se determinó en un espetrómetro Bruker – 400 a 400 MHz, usando acetona  $d_6$  como disolvente, los desplazamientos químicos se expresaron en ppm.

### Reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)

Los extractos fúngicos se disolvieron en acetona al 1.0 % (100 µg), se aplicaron en cromatofolios de gel de sílice 60F<sub>254</sub> y se eluyeron con una mezcla de diclorometano-metanol 9:1 (por duplicado). El disolvente se eliminó por evaporación y las placas se observaron bajo luz ultravioleta de onda corta (UV<sub>254</sub>) y larga (UV<sub>365</sub>), marcando las manchas observadas. Uno de los cromatofolios se reveló con ácido fosfomolibdico y el segundo con una solución de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) al 0.2 % disuelto en metanol, el cual permaneció a temperatura ambiente durante 12 horas. Como control positivo se utilizaron 10 µg de Vitamina C al 1.0 % (Redoxón, Lab. La Roche). La aparición de manchas amarillas contra un fondo púrpura indicó la presencia de metabolitos antioxidantes que se reportaron por la referencia frontal ( $R_f$  = distancia recorrida por el metabolito en el cromatofolio/ distancia recorrida por el disolvente) (Sánchez-Medina *et al.*, 2001).

### Microorganismos patogénicos

Las evaluaciones se realizaron contra las bacterias, *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva, ATCC 6633), *Erwinia carotovora* (Gram-negativa, ATCC 138), *Xanthomonas campestris* (Gram-negativa, ATCC 10547) y *Candida albicans* (ATCC 10231).

### Bioensayo antimicrobiano por el método de microdilución

Las bacterias blancas se cultivaron en agar Müller-Hinton (AMH) por 24 horas. Posteriormente, se transfirieron a caldo Müller-Hinton (CMH) fresco y se incubaron a 37 °C (*S. aureus* y *C. albicans*) y 25 °C (*E. carotovora* y *X. campestris*),

durante 18 horas. Los cultivos se ajustaron en CMH a una concentración final aproximada de  $1 \times 10^8$  ufc/mL por comparación visual con el tubo 0.5 del nefelómetro de McFarland (Andrews, 2001).

Los extractos fúngicos se diluyeron en dimetil sulfóxido (DMSO) a una concentración final de 16  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . En la primera fila de la microplaca se adicionaron 190  $\mu\text{L}$  de medio CMH estéril y 10  $\mu\text{L}$  del extracto fúngico (160  $\mu\text{g}$ ). Posteriormente, 100  $\mu\text{L}$  de esta mezcla homogénea se transfirieron al siguiente pozo y así sucesivamente hasta el pozo No. 4. Finalmente todos los pozos se inocularon con 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión de bacteria blanco (200  $\mu\text{L}$  de volumen final en cada pozo). La concentración final de los extractos fue de 400, 200, 100 y 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; para el DMSO de 2.5, 1.25, 0.625, y 0.312 %; y las bacterias a  $5 \times 10^5$  ufc/mL. Las microplacas se mantuvieron en incubación a las mismas condiciones mencionadas anteriormente para los patógenos, por 24 horas. Como control positivo se utilizó amikacina al 1.0 % (1.0  $\mu\text{L}$ ) para bacterias y para la levadura neomicol (1.0  $\mu\text{g}$ ). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

#### Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB)

Al finalizar el período de incubación, 1.0  $\mu\text{L}$  de la mezcla de cada pozo se inocularon en agar Müller-Hinton (AMH) y se incubaron a 25 o 37 °C por 24 horas, según el patógeno. La presencia de crecimiento bacteriano indicó un efecto bacteriostático y la ausencia de crecimiento un efecto bactericida (Taylor, 1983).

#### Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se adicionaron 50  $\mu\text{L}$  de Cloruro de Trifenil Tetrazolium (TTC) al 1.0 % y se mantuvieron en incubación por 30 minutos. La coloración roja intensa indicó la presencia de bacterias vivas y aquella concentración que permaneció incolora correspondió a la

CMI (Andrews, 2001).

#### Análisis Estadísticos

El porcentaje de biomasa micelial, los extractos orgánicos y el pH, se sometieron a un análisis de varianza utilizando el software SAS, seguido por comparación múltiple de medias (Tukey  $P=0.05$ ) (Steel y Torrie, 1986).

## Resultados

#### Rendimientos de biomasa micelial

El análisis estadístico de la biomasa micelial producida en los dos medios de cultivo utilizados mostró que no existen diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) para *B. japonica*, *B. portoricensis*, *Beltraniopsis* sp. y MR45. Para *G. murorum* si existe diferencia significativa ya que presentó un incremento micelial del 64 % en el cultivo en CPD (1.06 g/100 mL de medio) respecto al rendimiento micelial en CDL (0.41 g/100 mL de medio).

#### Rendimiento de los extractos

Los EFM y EFF de los hongos en estudio, con excepción de MR45, mostraron diferencias significativas ( $P = 0.05$ ) en los dos medios de cultivos empleados. En general, los mayores rendimientos en las extracciones con AcOEt se obtuvieron cuando las cepas se cultivaron en el medio CPD; tanto en los EFM (98–1645 mg/L de medio CPD) como en los EFF (52.7–1190 mg/L), con respecto a los correspondientes en CDL.

#### Reducción del radical DPPH

Los resultados del ensayo de la reducción del DPPH mostraron que las cepas *B. japonica*, *G. murorum* y MR45 poseen capacidad para producir metabolitos antioxidantes, en los dos medios de cultivo empleados (Tabla 1). En los tres casos, la actividad antioxidante se observó únicamente en los EFF. Asimismo, el perfil de composición en  $R_f$  es altamente

Tabla 1. Actividad antimicrobiana en el bioensayo de microdilución y de reducción del DPPH de los extractos crudos obtenidos de cinco cepas fúngicas, cultivadas en dos medios líquidos

| Cepa                              | Medio | <i>S. aureus</i> |                  | <i>E. carotovora</i> |                  | <i>X. campestris</i> |                  | DPPH ( $R_f$ ) |                             |
|-----------------------------------|-------|------------------|------------------|----------------------|------------------|----------------------|------------------|----------------|-----------------------------|
|                                   |       | EFM              | EFF              | EFM                  | EFF              | EFM                  | EFF              | EFM            | EFF                         |
| <i>Beltraniella japonica</i>      | CPD   | na               | 200 <sup>b</sup> | na                   | na               | na                   | na               | na             | 0.12                        |
|                                   | CDL   | 400 <sup>a</sup> | na               | 200 <sup>a</sup>     | 400 <sup>a</sup> | na                   | na               | na             | 0.05, 0.12, 0.22, 0.4, 0.8  |
| <i>Beltraniella portoricensis</i> | CPD   | 400 <sup>a</sup> | 200 <sup>a</sup> | na                   | na               | na                   | na               | na             | na                          |
|                                   | CDL   | 400 <sup>a</sup> | na               | na                   | 400 <sup>a</sup> | na                   | na               | na             | na                          |
| <i>Beltraniopsis</i> sp.          | CPD   | na               | na               | na                   | na               | na                   | na               | na             | na                          |
|                                   | CDL   | na               | na               | 400 <sup>b</sup>     | 400 <sup>b</sup> | 400 <sup>b</sup>     | na               | na             | na                          |
| <i>Gliomastix murorum</i>         | CPD   | na               | na               | na                   | na               | na                   | na               | na             | 0.012                       |
|                                   | CDL   | na               | na               | na                   | na               | na                   | na               | na             | 0.25, 0.29, 0.35, 0.46, 0.5 |
| MR45                              | CPD   | na               | 400 <sup>a</sup> | na                   | na               | na                   | na               | na             | 0.05, 0.72                  |
|                                   | CDL   | na               | na               | na                   | 400 <sup>b</sup> | na                   | 400 <sup>b</sup> | na             | 0.21, 0.72                  |
| Blanco                            | CPD   | na               | na               | na                   | na               | na                   | na               | na             | na                          |
|                                   | CDL   | na               | na               | na                   | na               | na                   | na               | na             | na                          |

a = Efecto bactericida b = Efecto bacteriostático na = No activo

EFF = Extracto fúngico del filtrado EFM = Extracto fúngico del micelio

DPPH:  $R_f$  de manchas con capacidad de reducir al DPPH en diclorometano-metanol 95:5

variable en cada medio líquido. En CDL, cinco componentes diferentes se detectaron para las cepas *B. japonica* ( $R_f = 0.05$ , 0.12, 0.22, 0.4 y 0.8) y *G. murorum* ( $R_f = 0.25$ , 0.29, 0.35, 0.46, y 0.5). En CPD el componente activo para *G. murorum* es de mayor polaridad ya que se observan en el punto de aplicación ( $R_f = 0.012$ ) y para *B. japonica* 0.12, que coincide con uno de los reportados en CDL. Por otra parte, la cepa MR45 revela la formación de dos componentes activos tanto en CPD ( $R_f = 0.05$  y 0.72) como en CDL ( $R_f = 0.21$  y 0.72), siendo los de menor polaridad de naturaleza similar en referencia frontal.

#### Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana se detectó en un total de 11 diferentes extractos obtenidos de las cinco cepas en estudio, cultivadas en dos medios líquidos diferentes (Tabla 1). La más alta actividad antibacteriana ( $\text{CMI} = 200 \text{ g/mL}$ ) se detectó en los EFF en el medio CPD de las dos especies de *Beltraniella* contra *S. aureus* y en el EFM de *B. japonica* cultivada en CDL contra *E. carotovora*. En general, todas las cepas fúngicas evaluadas manifestaron actividad inhibitoria cuando menos contra dos patógenos, en al menos uno de sus extractos. La cepa MR45 mostró un espectro amplio de actividad antimicrobiana ya que fue capaz de inhibir el crecimiento de las tres bacterias blanco, *E. carotovora*, *S. aureus* y *X.*

*campestris*. Por otra parte, los extractos de *G. murorum* no presentaron actividad antimicrobiana alguna.

Entre las cepas patogénicas evaluadas, la más sensible correspondió a *E. carotovora* la cual se inhibió con los extractos de *B. japonica*, *B. portoricensis*, *Beltraniopsis* sp. y MR45, cuyos principios activos se detectaron cuando se cultivaron en el medio CDL. Otra cepa sensible fue *S. aureus*, cuyo crecimiento se detuvo ante seis extractos pertenecientes a tres cepas, (*B. japonica*, *B. portoricensis* y MR45). Contra *X. campestris* solo se detectaron tres extractos capaces de inhibir su crecimiento, siendo estos el EFM y EFF de *Beltraniopsis* sp. y el EFF de MR45, obtenidos de CDL. Ninguno de los extractos evaluados mostró capacidad inhibitoria contra la levadura *Candida albicans*.

La actividad antimicrobiana se detectó principalmente en los extractos obtenidos cuando las cepas se cultivaron en el medio CDL (64 %). Entre éstos, los de *B. japonica* en CDL y todos los de *B. portoricensis* presentaron efecto bactericida; y para los extractos de *Beltraniopsis* sp. y MR45 en CDL el efecto se determinó como bacteriostático. En el medio CPD se registraron únicamente cuatro extractos activos, los EFM y EFF de *B. portoricensis* y el EFF de MR45 demostraron ser bactericidas; finalmente, el EFF de *B. japonica* con efecto bacteriostático sobre las bacterias patógeno.

## Discusión

Un total de 20 extractos orgánicos se obtuvieron a partir del micelio y filtrado al cultivar los cinco hongos seleccionados en dos medios líquidos, uno definido (CDL) y otro indefinido (CPD). Ambos medios son ampliamente utilizados en el cultivo de hongos anamórficos (Paterson y Bridge, 1994; Vizcaíno *et al.*, 2005), donde las especies seleccionadas crecieron exitosamente. Las evaluaciones antimicrobianas y antioxidantes de los extractos obtenidos tanto del micelio como del filtrado de cultivo demostraron que el 65 % de ellos tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de alguna de las bacterias evaluadas y/o la reducción del radical DPPH. Muy importante es destacar que la actividad estuvo dirigida en un 60 % hacia las bacterias Gram-negativas evaluadas, donde se observó principalmente un efecto bacteriostático (67 %). Para *S. aureus* la acción se detectó como bactericida en un 83 %.

En cuanto a la actividad antioxidante, las cepas de *B. japonica*, *G. murorum* y MR45 mostraron que sus EFF poseen varios metabolitos capaces de reducir el radical DPPH. Particularmente en el medio CDL se detectaron un mayor número de componentes activos, los cuales son excretados hacia el medio de cultivo por las células, ya que no se observan en los extractos miceliales. Las cepas mencionadas confirmaron su potencial antioxidante y en el presente estudio MR45 demostró producir metabolitos activos en los dos medios líquidos evaluados.

En general, únicamente el *B. japonica* mantuvo un perfil de actividad biológica similar al detectado cuando se cultivó en arroz fermentado (Reyes-Estebanez *et al.*, datos no mostrados). Al analizar por CG-EM los cuatro extractos de este hongo, se observó la producción consistente (EFF y EFM en CDL; EFF en CPD) de un compuesto mayoritario con un tiempo de retención de 7.95 minutos y un ión molecular a  $m/z$  178, el cual se identificó con la base de datos de EM del equipo como meleina. Esto se confirmó por la comparación

de sus datos de resonancia magnética nuclear de protones (1.55, 2.95, 4.76, 6.72, y 7.44 ppm) con los reportados en la literatura para este compuesto (Cole *et al.*, 2003). Meleina, también denominado ochracina, es un metabolito aislado de *Microsphaeropsis* sp., y reportado con actividad antimicrobiana (Höller *et al.*, 1999), pero no antioxidante. Esto concuerda con lo encontrado en nuestro trabajo ya que los tres extractos de *B. japonica* que contienen meleina demostraron alguna acción antibacteriana. Sin embargo, el EFM en CDL no fue capaz de reducir al DPPH, aún cuando diversos derivados de meleina han sido reportados con actividad antioxidante (Choudhary *et al.*, 2004).

El cuento *G. murorum*, al ser cultivado en los dos medios líquidos, perdió sus propiedades antimicrobianas, permaneciendo las antioxidantes en los EFF de CDL y CDP. Los CG-EM de EFM y EFF en CDL revelaron dos componentes mayoritarios de tiempo de retención de 9.96 y 18.5 minutos, con su ión molecular a  $m/z$  190 y 320, respectivamente. Sin embargo, éstos no correspondieron a ninguno de los compuestos de la base de datos del equipo, surgiendo la posibilidad de que se trate de estructuras poco comunes o novedosas. No se detectaron componentes en los CG-EM de los extractos en CPD, en la columna utilizada. Lo anterior permite deducir la diferencia del contenido en los extractos cuando en *G. murorum* se varía el medio de cultivo. *Gliomastix* es un género que ha sido muy poco explorado en cuanto a su contenido químico y taxonómicamente ha sido relacionado con el género *Acremonium*. En este aspecto, de una cepa de *Acremonium* sp., ha sido reportada la acremonina A y su glucósido como metabolitos antioxidantes (Abdel-Lateff *et al.*, 2002).

Los CG-EM del resto de los extractos activos de las cepas en estudio, indicó una alta variabilidad de componentes en sus cromatogramas. La mayor parte de estos no identificados, por lo que resultan de mucho interés para continuar las investigaciones químicas de estas especies.

El análisis integral de los resultados indica que en el

medio de CDL las cepas en estudio expresan mayor actividad biológica y variabilidad biosintética. Este comportamiento en los hongos ha sido ampliamente documentado en relación a los factores abióticos del medio artificial donde se cultivan (Frisvad *et al.*, 1998; Strohl, 2000; Bode *et al.*, 2002; Adrio y Demian, 2003).

En conclusión, se recomienda continuar el cultivo de estas cepas en el medio líquido de Czapek Dox enriquecido con extracto de levadura, ya que además de las propiedades biológicas y biosintéticas que se detectaron en las cepas estudiadas, resulta más fácil controlar los nutrientes, el pH y la aireación, con el propósito de llegar a optimizar la expresión de los principios activos (Demian, 2006).

Las exploraciones preliminares del comportamiento metabólico de cinco hongos anamórficos pertenecientes a la micoflora del sureste de México, guiaron a confirmar que éstos poseen la capacidad de producir metabolitos secundarios bioactivos aún cuando sean mantenidos en medios de cultivo diferentes. Este trabajo constituye una aportación enfocada hacia la aplicación biotecnológica a futuro de los hongos anamórficos de estas regiones poco exploradas. Estudios de la toxicidad e identificación estructural de los principios activos, así como de identificación taxonómica molecular se encuentran en curso.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a Susana De la Rosa-García, Fabiola Escalante y Luis Torres por su valioso apoyo en los CG-EM. Este trabajo fue financiado por la REDEMIC (XII.J.) del CYTED y el CONACyT (Proyecto No. 45794) y se agradece la beca doctoral a M.M.R.E. (84426).

## Literatura citada

Adrio, J.L., A.L. Demian, 2003. Fungal biotechnology. International Microbiology 6:191-199.

Abdel-Lateff, A., G.M. König, K.M. Fisch, U. Höller, P.G. Jones, A.D. Wright, 2002. New antioxidant hydroquinone derivatives from algicoloous marine fungus *Acremonium* sp. Journal of Natural Products 65: 1605-1611.

Andrews, J.M., 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 48: 5-16.

Anke, H., O. Stern, 2002. Insecticidal and nematicidal metabolites from fungi. In: Osiewacz, H.D. (ed.), The mycota. A comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany. pp. 109-127.

Bode, H.B., B. Bethe, H.R. Zeeck, 2002. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. ChemBioChem 3: 619-627.

Calvo, M.A., R.A. Wilson, J.W. Bok, N.P. Keller, 2002. Relationship between secondary metabolism and fungal development. Microbiology and Molecular Biology Reviews 66: 447-459.

Casas-López, J.L., J.A. Sánchez-Pérez, F.G. Fernández-Sevilla, E. Molina Grima, Y. Chisti, 2004. Fermentation, optimization for the production of lovastatin by *Aspergillus terreus*: use of response surface methodology. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 79: 1119-1126.

Choudhary, M.I., S.G. Musharraf, T. Mukhmoor, F. Shaheen, S. Ali, Atta-ur-Rahman, 2004. Isolation of bioactive compounds from *Aspergillus terreus*. Zeitschrift für Naturforschung -Section B Journal of Chemical Sciences 59: 324-328.

Cole, R., M. A. Schweikert, 2003. Handbook of secondary fungal metabolite vol II. Academic Press, United States of America. 622 p.

Demian, A.L., 2006. From natural products Discovery to commercialization: a success story. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 33: 486-495.

Fabio, A., P. Barros, E. Rodrigues-Filho, 2005. Four spiroquinazoline alkaloids from *Eupenicillium* sp. isolated as an endophytic fungus from leaves of *Murraya peniculata* (Rutaceae). Biochemical Systematics and Ecology 33: 257-268.

Frisvad, C.J.; U. Traen, O. Filtenborg, 1998. Role and use of secondary metabolites in fungal taxonomy. In: Frisvad; J.C., P.D. Bridge, D.K. Arora, (eds), Chemical fungal Taxonomy. Marcel-Decker, Nueva York pp. 289-319.

Gómez-López, A., A. Aberkane, E. Petrikou, E. Mellado, J.L. Rodríguez-Tudela, M. Cuenca-Estrella, 2005. Analysis of the influence of tween concentration, inoculum size, assay medium, and reading time on susceptibility testing of *Aspergillus* spp. Journal of Clinical Microbiology 43: 1251-1255.

Höller, U., M. König, M. A.D. Wright, 1999. Three new metabolites from marine-derived fungi of the genera *Coniothyrium* and *Microsphaeropsis*. Journal of Natural Products 62: 114-118.

Höller, U., A.D. Wright, G.F. Mattheé, G.M. König, S. Draeger, H.-J. Aust, B. Schulz, 2000. Fungi from marine sponges: diversity, biological activity and secondary metabolites. Mycological Research 104: 1354-1365.

Keller, N.P., G. Turner, J.W. Bennett, 2005. Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. Nature Reviews Microbiology 3: 937-947.

NIST 05MS spectra 2006. Departament of Commerce John Wiley & Sons, Inc Product Compilation Agilent Technologies, USA/P/NG1030-60305. Registry 7th Edition.

Paterson, R.R.M., P.D. Bridge, 1994. Biochemical techniques for filamentous fungi. International Micological Institute. CAB International Wallingford, UK.

Pittayakhajonwut, P., P. Sohsonboon, A. Drama, R. Suvannakad, S. Lapanum, M. Tantichareon, 2008. Antimycobacterial substances from *Phaeosphaeria* sp. BCC8292. Planta Medica 74: 281-286.

Robinson, T., D. Singh, P. Nigam, 2001. Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. Applied Microbiology and Biotechnology 55: 284-289.

Sánchez-Medina, A., K. García-Sosa, F. May-Pat, L.M. Peña-Rodríguez,

2001. Evaluation of biological activity of crude extracts from plants used in Yucatecan Traditional Medicine. Part I. Antioxidant, antitumoral and  $\beta$ -galactosidase inhibition activities. *Phytomedicine* 8: 144-151.

Steel, R.D.G., J.H. Torrie, 1988. *Bioestadística. Principios y procedimientos*. Segunda edición, McGraw-Hill, México D.F.

Strasser, H., D. Abendstein, H. Stuppner, T.M. Butt, 2000. Monitoring the distribution of secondary metabolites produced by the entomopathogenous *Beauveria brogniartii* with particular reference to oosporein. *Mycological Research* 104: 1227-1233.

Strohl, W.R., 2000. The role of natural products in a modern drug discovery program. *Drug Discovery Today* 5: 39-41.

---

Taylor, P.C., F.D. Schoenknecht, J.C. Sherris, E.C. Linner, 1983. Determination of minimum bactericidal concentrations of oxacillin for *Staphylococcus aureus*: influence and significance of technical factors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 23: 142-150.

Trigos A., G. Mendoza, M. Luna, G. Heredia, R.M. Arias, 2005. Evaluación antibacteriana de hongos microscópicos del suelo y restos vegetales. *Revista Mexicana de Micología* 20: 89-92.

Vizcaino, J.A., L. Sanz, A. Basilio, F. Vicente, S. Gutiérrez, M.R. Hermosa, E. Monte, 2005. Screening of antimicrobial activities in *Trichoderma* isolates representing three *Trichoderma* sections. *Mycological Research* 109: 1397-1406.